

通过非还原mAb亚基的高效LC-MS分析筛查原研药和生物类似药中未配对半胱氨酸的修饰

Samantha Ippoliti, Bradley Prater, Ying Qing Yu, Magnus Wetterhall

Similis Bio, Waters Corporation

摘要

本应用纪要重点介绍了Similis Bio与沃特世公司合作设计的一种快速筛查方法，用于分析单克隆抗体(mAb)原研药和生物类似药样品中的未配对半胱氨酸修饰。各种IgG亚类的保守序列均包含偶数个半胱氨酸残基，这些残基均以二硫键配对¹。然而，某些mAb的互补决定区(CDR)包含一个额外的未配对半胱氨酸，其可能与mAb生产过程中存在的游离半胱氨酸或谷胱甘肽发生反应。结合区存在这些未配对的半胱氨酸修饰可能会影响mAb的生物活性。本次合作的目的是开发一种基于液质联用(LC-MS)技术的简单快速的半胱氨酸修饰工作流程，以支持Similis Bio在mAb生物类似药的工艺开发过程中分析大规模样品组。有一种更高通量的工作流程可以支持这一目标，该工作流程涉及mAb亚基酶解，但不含还原步骤，因为这一步骤会混淆未配对的半胱氨酸和半胱氨酸修饰。考虑到这一点，我们开发出一种在非还原条件下进行的5分钟FabRICATOR®酶解方案，然后使用BioAccord™ LC-MS系统分析5分钟。使用waters_connect™信息学平台中的INTACT Mass应用程序，对所得的数据进行自动电荷去卷积、质量数匹配，在进样采集完成时计算每个样品的相对修饰丰度并报告结果。

优势

- 通过高速的5分钟非还原FabRICATOR亚基mAb酶解和5分钟LC-MS分析，可以快速、明确地分析Fab区未配对半胱氨酸的修饰

- 使用BioAccord LC-MS系统简化数据采集操作，作为一款专为适应不同专业水平的分析人员而设计的台式TOF质谱仪，任何分析人员都可以轻松使用它
- 利用配备Intact Mass应用程序的waters_connect信息学平台，借助其合规功能实现近乎实时的自动化数据采集、分析和报告

简介

过去十年来，单克隆抗体(mAb)已成为各类成功生物制药产品的重要组成部分。随着许多老产品逐渐失去市场独占权，许多公司正在投入研发mAb生物类似药。这些产品与原研药具有相同的蛋白质序列，但由于生产细胞系或工艺参数的差异，可能在修饰方面存在不同。对于从事生物类似药研发的公司而言，证明其生物类似药产品“与参比药品不存在有临床意义的差异”是基本目标²。这意味着，任何可能影响分子生物活性的一级结构变异（例如脱酰胺、氧化等）在与参比药品进行比较时必须保持在相似水平。液质联用(LC-MS)是一种强大的工具，可用于在完整、还原亚基和肽水平上表征这些修饰。

另一种重要的修饰是序列中任何未配对半胱氨酸残基的反应，但在生物制药mAb产品中不太常见。IgG由两条重链(HC)和两条轻链(LC)通过半胱氨酸残基之间的链间二硫键连接组成。重链和轻链中的其他半胱氨酸通过链内二硫键配对。链间二硫键和链内二硫键都有助于分子形成稳定的三级结构。一些mAb的高变区可能含有额外的未配对半胱氨酸残基。研究表明，这会导致药物稳定性下降，引起聚集现象，进而导致生物活性损失³。即使不存在稳定性问题，在生产过程中，这些残基的修饰（例如半胱胺酰化、谷胱甘肽化）也可能直接影响生物活性并破坏生物相似性。

未配对半胱氨酸的低产量修饰对完整mAb水平的典型LC-MS分析带来了独特的挑战。半胱胺酰化和谷胱甘肽化的质量数漂移分别为+119 Da和+305 Da。特别是半胱胺酰化的质量数漂移非常接近C端赖氨酸变体(+128 Da)，并且通常会淹没在各种复杂的N-糖型中。这些典型修饰可分别使用酶（例如羧肽酶B和PNGaseF）去除，但样品前处理时间可能较长，并且某些分子的处理可能不完全。为避免完整mAb分析更高的复杂性，科学家可以改用mAb亚基工作流程⁴⁻⁷。但是，使用这些方法难以分析未配对的半胱氨酸修饰，因为添加任何典型还原剂都会去除这种修饰，导致无法再在分析中检出。在肽图分析水平进一步地分析也面临着同样的挑战，因为额外的样品前处理复杂性和时间要求并不适合靶向分析。

为实现高效、快速的未配对半胱氨酸修饰筛查工作流程，我们选择进行非还原mAb亚基分析。有限酶解一直是释放铰链区衍生mAb亚基的一种方法，但IdeS酶等工具已成为一种更直接的方法，可以为LC-MS分析可靠地生成mAb亚基⁸。IdeS酶在铰链区下方的单个氨基酸位点进行剪切，在典型的还原条件下，会生成三种大小大致相等

(约25 kDa) 的亚基物质。这种酶在非还原条件下也非常高效（生成一个约100 kDa的(Fd'+LC)₂亚基和两个约25 kDa的Fc物质拷贝）。FabRICATOR (Genovis AB)是市场上使用最广泛的IdeS酶之一。我们将FabRICATOR酶的效率和高特异性与BioAccord系统的快速UPLC™-TOF分析相结合，成功实施了监测未配对半胱氨酸修饰的亚基工作流程（图1）。使用RapiZyme™胰蛋白酶对原研药样品进行非还原肽图分析证实了这些结果，并且使位点鉴定成为可能⁹。

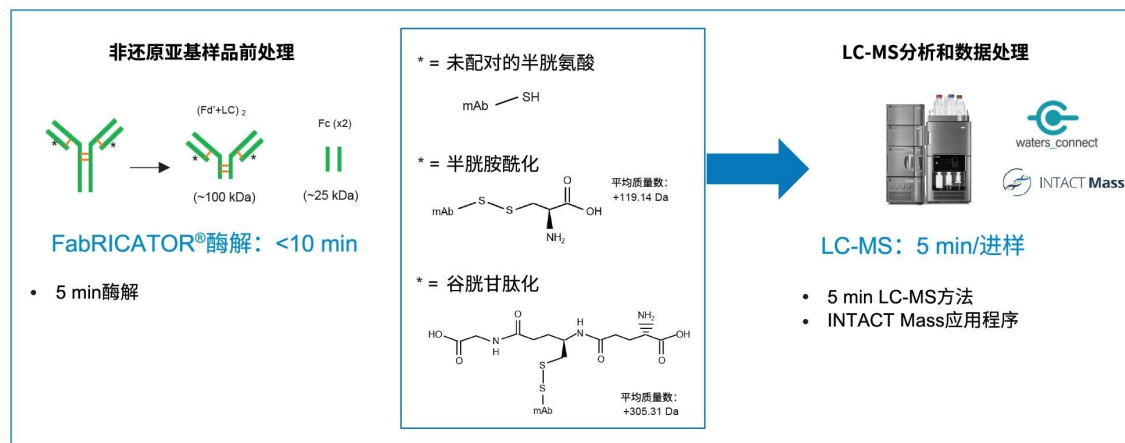


图1.非还原亚基LC-MS工作流程概述，包括使用*FabRICATOR*进行样品前处理，到使用*BioAccord*和 *waters_connect INTACT Mass*应用程序进行数据采集和分析。

实验

样品前处理（非还原亚基）：取3.3 μL约1.5 mg/mL的各样品（生物类似药样品直接取自生物反应器，并使用蛋白A捕获纯化）加入20 μL FabRICATOR预混液（0.5单位/μL FabRICATOR溶于25 mM Tris, pH 7.5）中，在37 °C下温育5分钟。（5 μg样品与10个单位的FabRICATOR一起温育（1:2比率））。用0.1%甲酸的水溶液按1:1（v/v）的比例稀释样品供LC-MS分析（最终样品浓度0.1 mg/mL）。

样品前处理（非还原肽图分析）：使用6 M尿素和2.5 mM碘乙酰胺(IAM)在50 °C条件下反应30分钟（总体积为50 μL，此步骤中mAb的浓度为1 mg/mL），对50 μg原研药参比物质进行变性处理并对游离半胱氨酸进行烷基化处理。用酶解缓冲液（100 mM Tris HCl, 10 mM CaCl₂, pH 7.5, p/n: [186010111](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186010111-quick-prep-tris-cacl2-) <
<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186010111-quick-prep-tris-cacl2->

[buffer-salts-ph-75-4-pk.html](#)>) 将样品稀释7倍, 并加入10 µg RapiZyme胰蛋白酶 (p/n: 186010108 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186010108-rapizyme-trypsin-ms-grade-4-pk.html>>) (1:5 w/w)。(稀释后的样品浓度为0.14 mg/mL, 含0.85 M尿素。) 在37 °C下将样品酶解2小时, 然后淬灭至最终浓度为0.3%甲酸(v:v)。

mAb亚基

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY Premier UPLC系统
检测:	ACQUITY UPLC TUV(280 nm)
色谱柱:	ACQUITY Premier BEH™ C4 300 Å, 1.7 µm, 2.1 x 50 mm (p/n: 186010326)
柱温:	80 °C
样品温度:	6 °C
进样:	0.25 µg经FabRICATOR酶解的mAb (0.1 mg/mL 样品进样2.5 µL)
流速:	0.4 mL/min
流动相A:	0.1%甲酸水溶液
流动相B:	0.1%甲酸的乙腈溶液

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.4	80	20	6
3.0	0.4	20	80	6
3.1	0.4	5	95	6
4.0	0.4	5	95	6
4.1	0.4	80	20	6
5.0	0.4	80	20	6

质谱条件

质谱系统：	ACQUITY RDa™
电离模式：	ESI正离子，全扫描
采集范围：	400~7000 m/z （高质量数）
毛细管电压：	1.5 kV
锥孔电压：	50 V
脱溶剂气温度：	550 °C
智能数据捕获：	开
转换阀：	0~0.5 min和4~5 min用于废液 0.5~4 min用于MS

肽图分析 - 聚焦DDA实验

*注：首先使用一种典型的基于全长DIA (MS^E)的肽图分析表征方法（详细信息请参阅应用纪要[720007840ZH⁹](#)）来鉴定目标肽段。鉴定完成后，将LC梯度调整为15分钟短梯度方法，并利用设置了 m/z 包含列表的DDA（数据依赖型采集）来表征未修饰和低水平修饰的半胱胺酰化物质。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY Premier UPLC系统
色谱柱：	ACQUITY Premier CSH™ C ₁₈ 肽分析专用柱, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 x 100 mm (p/n: 186009488)
柱温：	60 °C
样品温度：	6 °C
进样：	0.2 μg非还原胰蛋白酶酶解物 (0.14 mg/mL样品进样1.5 μL)
流速：	0.2 mL/min
流动相A：	0.1%甲酸水溶液
流动相B：	0.1%甲酸的乙腈溶液

梯度表（15 min聚焦方法）

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.2	85	15	6
2.5	0.2	85	15	6
9.5	0.2	80	20	6
10.5	0.2	15	85	6
12.0	0.2	15	85	6
12.1	0.2	85	15	6
15.0	0.2	85	15	6

质谱条件：Xevo™ G3（采用靶向DDA方法分析目标肽段）

质谱系统：	Xevo G3 QTof
电离模式：	ESI正离子，灵敏度模式
实验类型：	设置了包含列表的DDA
采集范围：	50–2000 <i>m/z</i>
毛细管电压：	2.2 kV
锥孔电压：	20 V
离子源温度：	120 °C
脱溶剂气温度：	350 °C
锥孔气流速：	35 L/h
脱溶剂气流速：	600 L/h
碰撞能量：	取决于质量数的梯度 (低质量数10-30 V，高质量数25-55 V)
DDA设置：	· 扫描时间0.2 s · MSMS：最多同时进行2个MSMS采集 · 使用全扫描谱设置 · 在强度超过7500计数/秒时启动MSMS · 停止MSMS，直到达到条件（累积TIC升至阈值3,000,000计数以上）或超时（5.0秒） · 电荷态：2+、3+、4+、5+ · 去同位素：关

DDA包含列表：

1. RT处的峰：m/z 913.39（4+电荷态），8.1 min 处
2. RT处的峰：m/z 928.89（4+电荷态），7.4 min 处

数据管理

使用waters_connect信息学平台（3.1版）中的Intact Mass应用程序（1.4.0.0版）采集和处理亚基数据。使用waters_connect信息学平台（3.1版）中的UNIFI™应用程序（3.1.0.16版）收集肽图分析数据，并按肽图分析工作流程处理数据。

结果与讨论

本研究实施的非还原mAb亚基工作流程为快速筛查未配对的半胱氨酸残基及其潜在修饰提供了一条明路。本研究将其应用于一种原研药和Similis Bio提供的生物类似药样品子集，以评估各种细胞培养条件对半胱胺酰化和谷胱甘肽化水平的影响，最终目标是快速处理大规模样品组以支持生物类似药工艺开发。通过5 min非还原FabRICATOR酶解方案制备样品，然后在BioAccord LC-MS系统上采用5 min LC-MS方法进行分析。使用INTACT Mass应用程序中的Acquire and Process（采集和处理）功能，科学家能够快速提交样品进行分析、监测实时数据进程，以及在每次进样完成采集后查看自动去卷积和报告的结果。

在非还原条件下，FabRICATOR酶产生了共价连接的(Fd' +LC)₂物质（约100 kDa）和解离的Fc链（约25 kDa），如UV（图2A）和TIC（图2B）色谱图所示。Fc物质（峰1）包含N-糖型和未加工的C端赖氨酸，在进行完整mAb分析时，这些物质会干扰半胱胺酰化和谷胱甘肽化结果。去除复杂的Fc修饰后，(Fd' +LC)₂物质（峰3）仅显示可能的糖基化、未配对半胱氨酸修饰和/或氧化。（注：(Fd' +LC)₂也可能发生异构化和脱酰胺，但由于其质量数差异较小，只有使用肽水平的分析才能识别出来。）这种非还原FabRICATOR方法的另一个额外优势是Fab结构域的双臂保持完整，因此，单修饰和双修饰的未配对半胱氨酸物质同时存在并且可定量。此信息至关重要，尤其是在生物活性因一个或两个半胱氨酸是否被修饰而存在差异的情况下（尤其是对于多价抗体）。

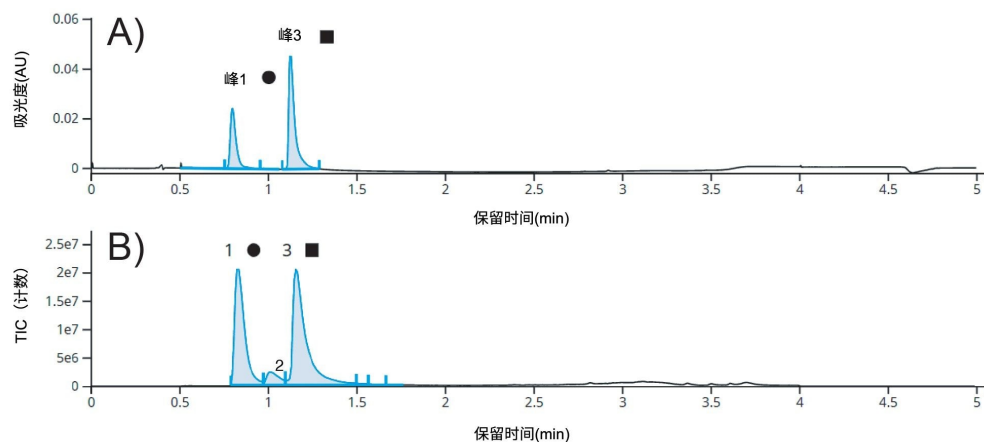


图2.五分钟LC-MS分析进样0.25 µg原研药mAb非还原FabRICATOR酶解物的UV（图A）和TIC（图B）色谱图。峰1对应Fc（约25 kDa）物质，峰3对应(Fd'+LC)₂（约100 kDa）物质。（小峰（峰2）的质量数对应FabRICATOR酶。）

INTACT Mass应用程序处理方法纳入了半胱胺酰化、谷胱甘肽化、糖基化和氧化的可变修饰，可根据最大质量数匹配误差20 ppm将这些修饰自动分配给去卷积质量数。计算(Fd' + LC)₂物质所有指定形式的相对丰度百分比，并报告在每次分析的汇总表中。图3显示了样品子集的去卷积谱图：原研药显示出“低”水平的半胱氨酸修饰，两种生物类似药样品分别显示出“中等”水平和“高”水平的半胱氨酸修饰。+1和+2半胱胺酰化用红色箭头标记，+1谷胱甘肽化用绿色箭头标记（在所有样品中均未检测到+2谷胱甘肽化）。样品组的详细结果见表1。原研药的修饰水平约5%，与根据Similis Bio提供的正交数据得到的预期值一致。生物类似药样品的半胱氨酸修饰水平在16%-63%范围内。在该样品组中，测得(Fd' + LC)₂物质糖基化的范围为2%-11%。这些结果表明，该亚基mAb方法能够对浓度低至0.5%的各种物质进行可靠的相对定量。

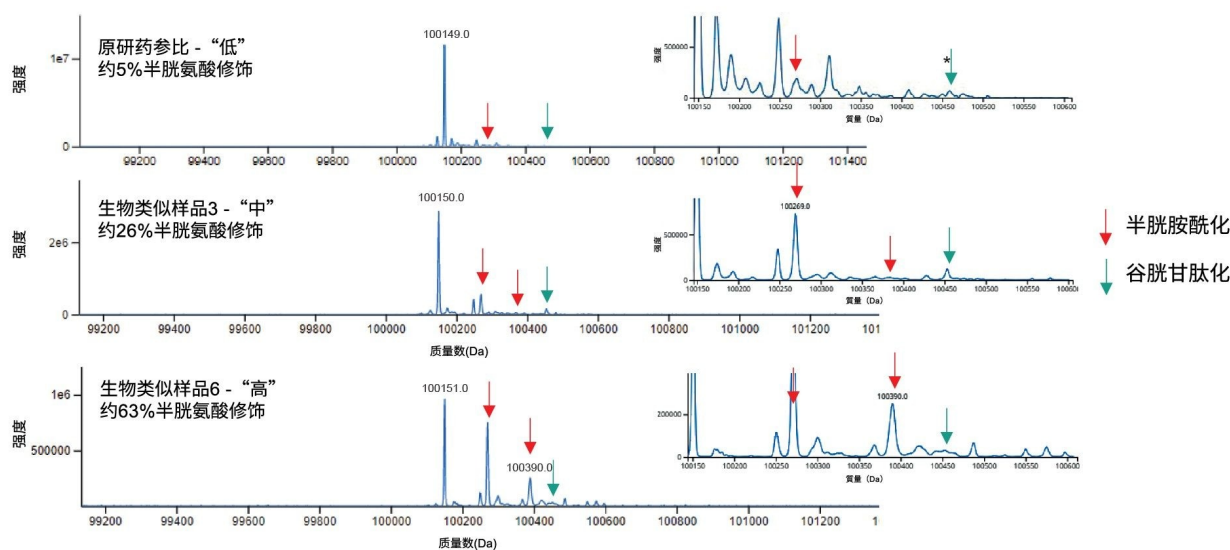


图3.原研药参比样品、生物类似药样品3和生物类似药样品6经非还原*FabRICATOR*酶解得到的(*Fd'*+*LC*)₂物质的去卷积谱图，三种样品的半胱氨酸修饰水平分别为“低”、“中”、“高”，放大图显示了修饰情况。利用*Intact Mass*应用程序中的自动去卷积设置进行了去卷积处理。*通过对生物类似药样品中较高水平谷胱甘肽化的可靠分配，进一步支持了对原研药中低水平谷胱甘肽化的分配。

样品名称	0x半胱氨酸修饰 (游离半胱氨酸) (%)	总半胱氨酸酰化 (%)	总谷胱甘肽化 (%)
原研药 (参比)	87.9	4.2	0.9
生物类似药样品1	81.4	14.9	1.6
生物类似药样品2	75.1	10.4	3.6
生物类似药样品3	69.3	19.6	6.0
生物类似药样品4	64.4	26.0	4.7
生物类似药样品5	36.8	55.2	3.7
生物类似药样品6	35.0	60.2	3.1

表1.不同生产工艺下原研药和生物类似药样品的未配对半胱氨酸修饰结果汇总。“总”半胱氨酸酰化和谷胱甘肽化值是包含一个未配对的半胱氨酸修饰与两个未配对的半胱氨酸修饰的(*Fd'*+*LC*)₂物质之和。其余2~11%的(*Fd'*+*LC*)₂物质的去卷积MS信号来自糖基化物质。

为确认在原研药样品中观察到的半胱胺酰化确实位于轻链中预期的未配对半胱氨酸上，我们进行了非还原肽图分析。在用胰蛋白酶酶解之前，用尿素对样品进行变性，并用IAM预烷基化，以封闭任何存在的未配对半胱氨酸。如果未使用烷基化试剂封闭未配对半胱氨酸，它们在酶解过程中更容易产生二硫键的干扰，导致分析难度增加，因为会产生错误的二硫键肽段。接下来稀释样品，以降低RapiZyme胰蛋白酶酶解中的尿素浓度，酶:蛋白质(w/w)的比率为1:5。淬灭酶解反应，使用之前发表的LC-MS方法，在Xevo G3 QTof质谱仪上运行DIA (MS^E) 碎裂模式，分析得到的酶解物¹⁰。

含有假定未配对半胱氨酸的肽还包含第二个半胱氨酸残基，该残基参与了链内二硫键的形成。因此，目标物质实际上是通过二硫键连接的两种肽，标记为“2:T2-2:T7”。这种肽带有+1半胱胺酰化或+1“IAM”修饰（通过碘乙酰胺预烷基化），意味着这是未配对、未修饰的半胱氨酸。这两种物质分别在26.5分钟和27.2分钟洗脱，如TIC积分色谱图所示（图4）。

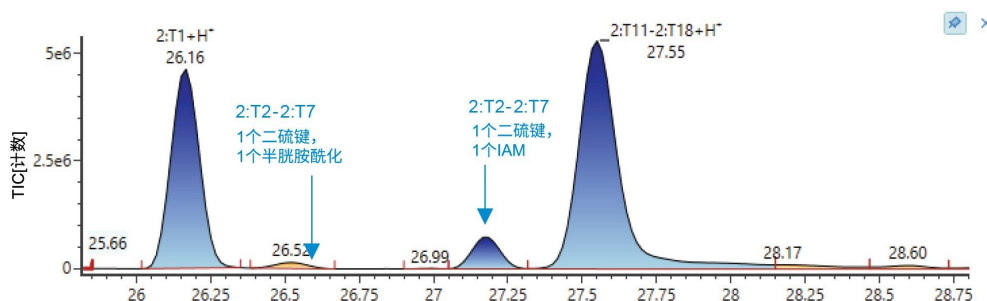


图4.非还原肽图分析结果。图中显示了放大的TIC积分色谱图，含有预期未配对半胱氨酸的肽在其中洗脱。在TIC色谱图(26.5 min)中，半胱胺酰化物质与另一种肽共流出，但在去卷积质谱图中可以清楚区分。

利用较长时间的LC梯度方法检测到目标肽段后，我们开发了一种使用聚焦梯度的15分钟短梯度LC-MS方法进行靶向分析（数据未显示）。在15分钟方法中，修饰半胱氨酸肽(m/z 928.9)和未修饰半胱氨酸肽(m/z 913.4)分别在7.4 min和8.1 min洗脱。使用该保留时间和 m/z 信息创建带包含列表的靶向DDA（数据依赖型采集），确保仅检测和碎裂这些目标肽段。通过比较得到的半胱胺酰化和烷基化肽碎片离子数据（图5）确定修饰位置。半胱胺酰化肽中存在y9 + 半胱氨酸（未配对半胱氨酸肽中存在相应的y9 + IAM烷基化修饰），证实了该位置为预期的未配对半胱氨酸（以黄色突出显示）。

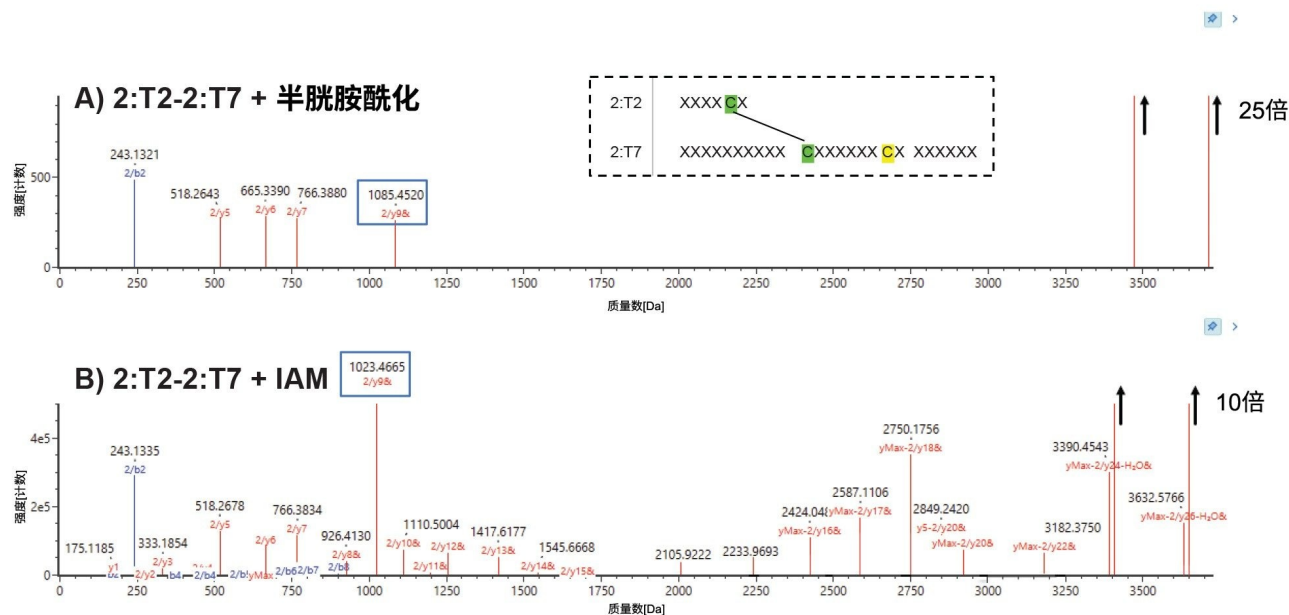


图5.二硫键连接的肽(2:T2-2:T7)的匹配碎片离子图，其中包含预期的未配对半胱氨酸（以黄色突出显示）。图A：半胱胺酰化修饰，图B：IAM烷基化形式。通过检查y碎片离子Ladder，确认半胱胺酰化的位置在预期的未配对半胱氨酸上，修饰质量数差异系列从对应于y9碎片离子的半胱氨酸开始，继续到y-max碎片离子。

结论

本应用纪要展示了一种对非还原亚基mAb快速筛查工作流程的成功方法优化，用于测量IgG1 mAb的Fd'或LC中未配对半胱氨酸上的半胱胺酰化和谷胱甘肽修饰水平。该工作流程在非还原条件下进行5 min的FabRICATOR酶解，然后在合规的waters_connect信息学平台下运行BioAccord LC-MS系统进行LC-MS分析。利用INTACT Mass应用程序的自动去卷积、质量数分配和报告功能，精简了从样品到报告的整个工作流程。本例研究了原研药和来自Similis Bio的mAb生物类似药样品，使用非还原亚基方法观察到较宽范围(5–63%)的半胱氨酸修饰水平，并通过原研药参比样品的非还原肽图分析，在预测位点上确认了未配对修饰半胱氨酸残基的存在。

这种针对游离和修饰半胱氨酸位点分析的优化亚基mAb LC-MS工作流程可以轻松采用和实施，以支持原研药或候选生物类似药的产品开发和工艺开发。将waters_connect信息学平台与BioAccord系统配合使用，能够部署相同的平台用于支持生产或产品质量评估（如果证明该位点为关键质量或工艺属性）。

参考资料

1. Liu H, May K. Disulfide bond structures of IgG molecules: Structural Variations, Chemical Modifications and Possible Impacts to Stability and Biological Function.*mAbs*.2012; 4(1): 17–23.
2. Biosimilar Basics for Patients.*FDA website*.<<https://www.fda.gov/drugs/biosimilars/biosimilar-basics-patients> <<https://www.fda.gov/drugs/biosimilars/biosimilar-basics-patients>> > Accessed 7 Nov 2023.
3. Banks DD, Gadgil HS, Pipes GD, Bondarenko PV, Hobbs V, Scavezze JL, Kim J, Jiang X, Mukku V, Dillon TM. Removal of Cysteinylation from an Unpaired Sulfhydryl in the Variable Region of a Recombinant Monoclonal IgG1 Antibody Improves Homogeneity, Stability, and Biological Activity.*J Pharm Sci*.2008; 97:2, 775–790.
4. Ippoliti S, Yu YQ, Ranbaduge N, Chen W. 建立适用于开发、工艺监测和QC放行且稳定耐用的mAb亚基产品质量属性监测方法.沃特世应用纪要 70007129ZH.2021年.
5. Sokolowska I, Mo J, Dong J, Lewis M, Hu P. Subunit Mass Analysis for Monitoring Antibody Oxidation. *mAbs*.2017; 9:3, 498–505.
6. Sokolowska I, Mo J, Pirkolachahi F, McVean C, Meijer L, Switzar L, Balog C, Lewis M, Hu P. Implementation of a High-Resolution Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method in Quality Control Laboratories for Release and Stability Testing of a Commercial Antibody Product.*Anal Chem* .2020; 92, 2369–2373.
7. Nägeli A, Ekemohn M, Nyhlén H. Automated Middle-level Analysis of Therapeutic mAbs in Complex Protein Samples.Genovis Application Note.AN0056.
8. Gadgil HS, Bondarenko PV, Pipes GD, Dillon TM, Banks D, Abel J, Kleemann GR, Treuheit MJ. Identification of Cysteinylation of a free Cysteine in the Fab Region of a Recombinant Monoclonal IgG1 Antibody Using Lys-C Limited Proteolysis Coupled with LC/MS Analysis.*Anal Biochem*.2006; 355, 165–174.
9. Ippoliti S, Zampa N, Yu YQ, Lauber MA.使用RapiZyme胰蛋白酶进行生物制药表征的通用快速酶解方案.沃特世应用纪要 720007840ZH.2023年.
10. DeLaney K, Ippoliti S, Reid L, Cornwell O, Yu YQ, Harry E, Towers M. 在Xevo™ G3 QToF平台上应用肽图分

析和多属性方法(MAM)工作流程执行mAb药品的生物类似药比较.沃特世应用纪要.720007632ZH.2022年.

FabRICATOR是Genovis AB的注册商标。BioAccord、RapiZyme、waters_connect、ACQUITY、BEH、CSH和RDa是沃特世科技公司的商标。

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

UNIFI生物制药平台解决方案 <<https://www.waters.com/10195515>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

waters_connect <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>>

BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry/mass-spectrometry-systems/bioaccord-lc-ms-system.html>>

Xevo G3 QToF <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry/mass-spectrometry-systems/xevo-g3-qtof.html>>

720008305ZH, 2024年4月



© 2025 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)